

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Chemie

Študijný obor: Chemie



**Kristína Štafurová**

Vývoj metódy pre voltampérometrické stanovenie chloramfenikolu na  
striebovej amalgámovej filmovej elektróde obnoviteľnej mechanizmom  
klikacieho pera

Development of method for the voltammetric determination of  
chloramphenicol at retractable pen-based renewable silver amalgam film  
electrode

Bakalárska práca

Vedúci práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2021

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som túto záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 17.6.2021

podpis

## **PodĎakovanie**

Rada by som sa poĎakovala svojmu školiteľovi RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. a prof. RNDr. Jiřimu Barekovi, CSc. a Jůliusovi Gajďárovi, Ph.D. za odborné vedenie a cenné pripomienky k mojej práci. Ďakujem taktieĎ svojim rodičom za podporu počas celého štúdia.

Tento výskum bol podporovaný Grantovou agentůrou Ćeskej republiky (projekt 20-01417J).

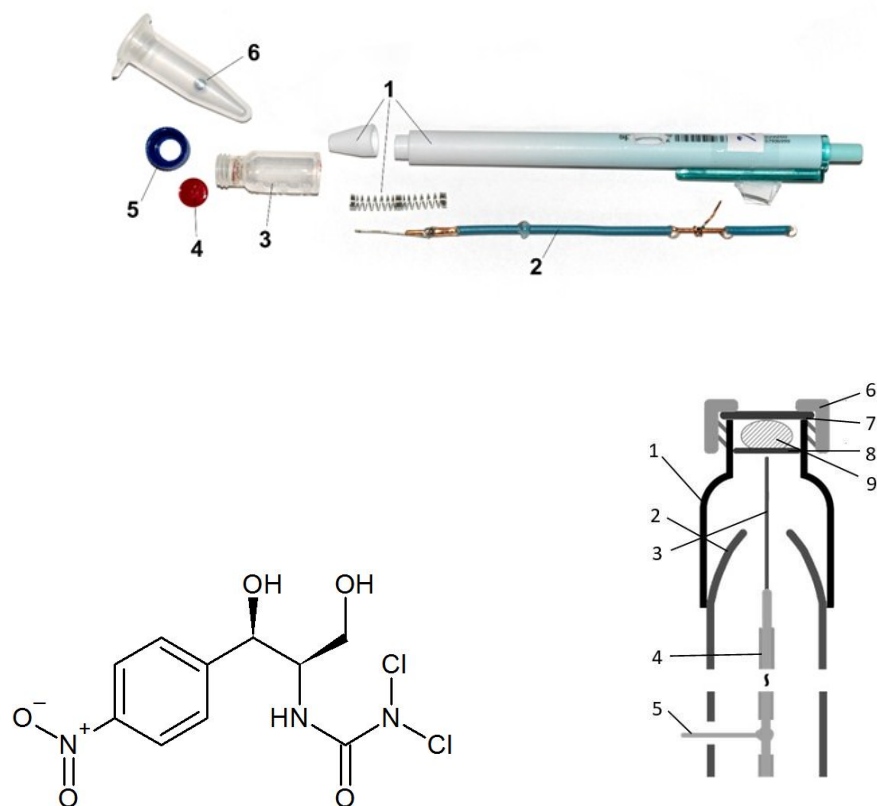
Ďalej Ďakujem firme Metrohm ĆR za technicků, materiálnu a intelektuálnu podporu.

## Abstrakt

Táto práca sa zaoberá stanovením chloramfenikolu (CLF) metódou diferenčnej pulznej voltampérometrie (DPV) na striebornej amalgámovej filmovej elektróde obnoviteľnej mechanizmom klikacieho pera (RAE). Boli nájdené optimálne podmienky pre stanovenie chloramfenikolu. Tie boli aplikované pri premeraní kalibračnej závislosti a následnom určení medze stanoviteľnosti. Bol sledovaný vplyv pH v prostredí Brittonovho-Robinsonovho pufru a stálosť signálu pri opakovaných meraniach.

Pre stanovenie CLF technikou DPV bol ako optimálne prostredie vyhodnotený Brittonov-Robinsonov pufr o pH 7. Za týchto podmienok boli premerané koncentračné závislosti v rozsahu  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> a  $1 \cdot 10^{-4}$ – $8 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Medza stanoviteľnosti CLF bola určená na  $1,4 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> pre techniku DPV.

## Grafický abstrakt



Adaptované z <sup>26</sup>

### Hlavné prínosy práce

- Aplikácia RAE pre sledovanie pesticídov
- Eliminácia pasivácie rýchlou mechanickou úpravou
- Nová metóda pre stanovenie chloramfenikolu

## Abstract

This diploma thesis is focused on the determination of chloramphenicol (CLF) by differential pulse voltammetry (DPV) on retractable-pen-based renewable silver amalgam film electrode (RAE). For the determination of chloramphenicol the optimum conditions were found. Under these conditions concentration dependences were measured and then limits of quantification were calculated. The effect of pH of Britton-Robinson buffer was tested and the stability of the signal with repeated measurements was monitored.

For determination of CLF by DPV BR buffer pH 7 was chosen as an optimum background electrolyte. Under these conditions linear dependences were obtained in the concentration range of  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> and  $1 \cdot 10^{-4}$ – $8 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>. The limit of determination for CLF by DPV at  $1,4 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> was found.

**Kľúčové slová:**

Obnoviteľná elektróda

Strieborná amalgámová filmová elektróda

Voltampérometria

Chloramfenikol

Minimalizácia pasivácie

**Keywords:**

Renewable electrode

Silver amalgam film electrode

Voltammetry

Chloramphenicol

Passivation minimalization

## Zoznam použitých skratiek a symbolov

BR pufor	Brittonov-Robinsonov pufor
CLF	chloramfenikol
CV	cyklická voltampérometria
DPV	diferenčná pulzná voltampérometria
DCV	DC voltampérometria
AdSV	absorpčná rozpúšťacia voltampérometria
$E_p$	potenciál píku [mV]
$I_p$	prúd píku [nA]
HgFE	ortuťová filmová elektróda
HMDE	visiaca ortuťová kvapková elektróda
DME	kvapkajúca ortuťová elektróda
m-AgSAE	meniskom modifikovaná strieborná pevná amalgámová elektróda
RAE	strieborná filmová amalgámová elektróda obnoviteľná mechanizmom klikacieho pera
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iónov
$LOQ$	medza stanoviteľnosti
$c$	molárna koncentrácia
$d$	priemer



# Obsah

1. Úvod .....	10
1.1 Cieľ práce.....	10
1.2. Stanovovaná látka .....	10
1.2.1. Použitie a biologické účinky .....	11
1.2.2. Metódy stanovenia .....	12
1.3. Používané metódy.....	14
1.3.1. Cyklická voltampérometria (CV).....	14
1.3.2. Diferenčná pulzná voltampérometria (DPV) .....	15
1.4. Používané elektródy.....	16
1.4.1. Obnoviteľná strieborná amalgámová filmová elektróda.....	16
2. Experimentálna časť .....	18
2.1 Chemikálie a materiály .....	18
2.2 Aparatúra .....	19
2.3 Pracovné postupy.....	20
3. Výsledky a diskusia .....	22
3.1 Optimálne podmienky pre stanovenie chloramfenikolu (CLF).....	22
3.2 Analytické parametre .....	24
3.3. Kalibračná závislosť .....	25
4. Záver.....	31
5. Literatúra .....	32

# 1. Úvod

## 1.1 Cieľ práce

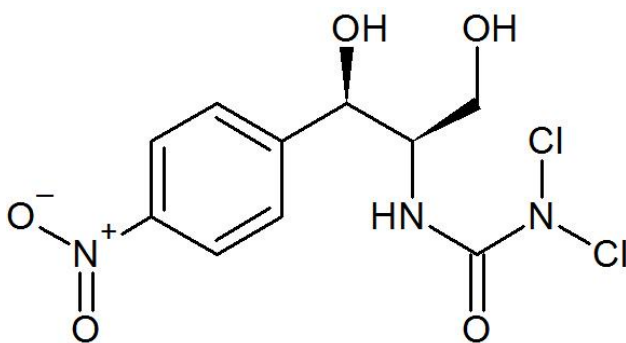
Táto bakalárska práca sa zaoberá vývojom metód pre voltampérometrické stanovenie liečiva chloramfenikol. Jej cieľom je nájsť vhodné podmienky pre stanovenie a určiť najnižšiu medzu stanoviteľnosti tejto látky na striebornej amalgámovej filmovej elektróde obnoviteľnej mechanizmom klikacieho pera použitím techniky diferenčnej pulznej voltampérometrie.

## 1.2. Stanovovaná látka

Chloramfenikol (CLF) je biely, sivobiely alebo nažltlý biely jemný kryštalický prášok alebo jemné kryštály. Je ťažko rozpustný vo vode, ľahko rozpustný v 96 % etanole a v propylénglykole. Radí sa medzi širokospektrálne antibiotiká. Prvýkrát bol izolovaný zo *Streptomyces venezuelae* <sup>1</sup>. Tabuľka 2.1 uvádza základné informácie o chloramfenikole.

Tabuľka 1.2

Systematický názov	2,2-dichlor-N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrofenyl)ethyl]acetamid
CAS Name	Chloramphenicol
Ďalšie názvy	Amphenicol, Chloramex, Chlorocid, Chloromycetin, Chloronitrim, Fenicol; Leukomycin, Levomicetina, Loromisin, Mastiphe, Mycinol, Novomycetin
Sumárny vzorec	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Relatívna molekulová hmotnosť	323,12
CAS registračné číslo:	56-75-7



Obr.1.2: Štruktúra chloramfenikolu

### 1.2.1. Použitie a biologické účinky

CLF pôsobí proti väčšine gram-pozitívnych a gram-negatívnych a väčšine anaeróbných baktérií <sup>2</sup>. Používa sa k liečbe očných infekcií postihujúcich rohovky alebo spojivky vo forme očných kvapiek <sup>3</sup>. V minulosti sa používal na liečbu detskej meningitídy a je silným liekom na brušný týfus <sup>4</sup>.

Je metabolizovaný v pečeni na neaktívne produkty, za tvorby konjugátov s kyselinou glukurónovou. Iba 5-15 % látky je vylučovanej v nezmenenej forme, prevažne močom. Polčas eliminácie je približne 4 hodiny <sup>5</sup>.

Nízke náklady na výrobu a široké spektrum účinku proti baktériám sú dôvodom jeho hojného použitia v živočíšnej výrobe. Využívaný je taktiež vo veterinárnej praxi ako doplnková látka pre podporu rastu. Preukázalo sa, že určité množstvo zvyškov antibiotík v ľudských potravinách môže vyvolať u niektorých citlivých jedincov alergické reakcie i poškodenie imunitného systému <sup>6</sup>.

V miernych dávkach a pri krátkodobom použití je CLF relatívne bezpečný, ale pri dlhodobejšej terapii sa môže vyvinúť ťažké toxické poškodenie krvotvornej sústavy. Jeho prejavom je aplastická anémia (neschopnosť kostnej drene produkovať krvinky) <sup>2</sup>. Z týchto dôvodov sú dnes jeho klinické aplikácie obmedzené. Pre použitie v potravinách živočíšneho pôvodu bol zakázaný na území celej Európskej únie, Spojených štátov amerických, Kanade a mnohých ďalších krajinách. V rozvojových zemiach je však stále veľmi rozšírený, najmä pri živočíšnej výrobe <sup>7</sup>.

### 1.2.2. Metódy stanovenia

Pro stanovenie CLF boli vyvinuté mnohé techniky. Patria sem predovšetkým kvapalinová <sup>8, 9</sup> a plynová chromatografia <sup>10, 11</sup>, UV spektrofotometria <sup>12</sup> alebo kapilárna zónová elektroforéza <sup>13</sup> s ampérometrickou detekciou <sup>14</sup>. V praxi je najviac využívané spojenie kvapalinovej alebo vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou detekciou <sup>8, 15</sup>. Nevýhodou týchto metód sú vysoké investičné a prevádzkové náklady a náročnosť na kvalifikovaný personál.

CLF bol stanovovaný i mnohými elektroanalytickými metódami, ktoré sú zvyčajne lacnejšie, jednoduchšie a užívateľsky prívetivejšie <sup>16, 17</sup>. V práci <sup>17</sup> bol CLF stanovovaný na meniskom modifikovanej striebornej pevnej amalgámovej elektróde (m-AgSAE) technikou diferenčnej pulznej voltampérometrie (DPV), DC voltampérometrie (DCV), cyklickej pulznej voltampérometrie (CV) a absorpčnej rozpúšťacej voltampérometrie (AdSV). Za optimálne prostredie pre stanovenie CLF bolo vyhodnotené prostredie Brittonovho-Robinsonovho pufru o pH 7 pre metódu DCV a o pH 8 pre DPV. Za týchto podmienok boli premerané kalibračné závislosti v koncentračnom rozmedzí  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , pričom pri DCV látka vykazovala lineárnu závislosť signálu iba v rozsahu  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a pri DPV v celom meranom rozsahu. Pri stanovení CLF metódou DCV bola dosiahnutá medza stanoviteľnosti  $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pre stanovenie CLF metódou DPV bola dosiahnutá medza stanoviteľnosti  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Štúdia <sup>18</sup> ponúka prehľad mnohých analytických metód vyvinutých pre detekciu CLF. Práca <sup>19</sup> predstavuje súhrn najdôležitejších metód pre detekciu zvyškov vybraných antibiotík (vrátane CLF) vo vzorkách potravín. Sumarizácii optických a elektrochemických aptasenzorov pre stanovenie amfenikolov sa venovali v práci <sup>20</sup>.

Vzhľadom na prítomnosť ľahko elektrochemicky redukovateľnej nitroskupiny sa pre stanovenie CLF ponúkajú moderné voltampérometrické metódy. Štúdia <sup>21</sup> sa venuje mechanizmu redukcie nitroskupiny pri elektrochemických dejoch. Nitroskupina priťahuje elektródy, čo napomáha ich delokalizácii. Aromatické nitroskupiny majú

preto veľký vplyv na distribúciu elektrónov v molekule (alebo v častiach molekuly). Pretože dusík v nitroskupine sa nachádza v oxidačnom stave +III, táto skupina môže pôsobiť ako akceptor elektrónov. Za redukčných podmienok vie byť nitroskupina redukčne transformovaná na nitroso-, hydroxylamino- a nakoniec na aminoskupinu.

Acidobazická rovnováha často sprevádza redukcie vo vodných roztokoch. Konjugované kyseliny sú vo všetkých prípadoch jednoduchšie redukovateľné (pri kladnejších potenciáloch) než korešpondujúce zásady. Protonácia zásady sa preto často vyskytuje pred prenosom elektrónov. Pokiaľ je táto preprotonácia dostatočne rýchla, všetky vzorky sa prevedú na konjugovanú kyselinu, ktorá sa redukuje. Rýchlosť takejto preprotonácie klesá so zvyšujúcim sa pH až do bodu, kým pri dostatočne vysokom pH prakticky nedochádza k tvorbe kyseliny a konjugovaná zásada môže podstúpiť redukciu, zvyčajne pri negatívnejších potenciáloch. Redukciou neprotonovaných vzoriek sa získa radikálny anión alebo dianión, ktoré sú zvyčajne silnými zásadami. Negatívne nabité vzorky teda prijímajú protón od dostupných donorov.

Pri prechode prvého elektrónu na nitrobenzén (alebo jeho protonovanú formu) v aprotickom rozpúšťadle sa produkuje nitrobenzénový radikálový anión (alebo jeho protonovaná forma). V radikálovom anióne alifatickej zlúčeniny je náboj na nitroskupine jednotný. Na rozdiel od toho, v radikálových aniónoch nitrobenzénov dochádza k určitej delokalizácii náboja na základe meraní elektrónovej spinovej rezonancie.

Nitrobenzén sa redukuje vo vodnom prostredí na ortuťových, zlatých alebo molybdénových elektródach pri nízkom pH v podobe dvoch vln/vrcholov a pri vysokom pH v podobe jednej vlny/vrcholu. Cyklická voltampérometria (CV) v neutrálnom pufrí poskytuje štvorelektrónový redukčný pík hydroxylaminobenzénu, ktorý je na anodickej časti cyklu reoxidovaný na nitrosobenzén, v katodickej časti druhého cyklu sa pozoruje redukcia nitrosobenzénu.

### 1.3. Používané metódy

#### 1.3.1. Cyklická voltampérometria (CV)

Cyklická voltampérometria je metóda, pri ktorej sa na stacionárnu elektródu v nemiešanom roztoku vkladá potenciálový program s cyklickým trojuholníkovým priebehom. Potenciál sa mení podľa zvoleného režimu polarizačnej rýchlosti jedným smerom a potom smerom opačným za súčasného merania prúdu.

Rozmedzie, v ktorom sa pri CV napätie mení, sa volí podľa toho, pri akých hodnotách nastáva oxidácia alebo redukcia daného analytu alebo produktu jeho elektrochemickej reakcie. Potenciál, pri ktorom dochádza k otočeniu cyklu, mení sa smer polarizácie elektródy, sa nazýva prepínací potenciál. Cyklus môže trvať od menej než 1 ms až po 100 s a viac. Celý cyklus možno opakovať podľa potreby <sup>22</sup>.

Napätie je merané medzi referenčnou a pracovnou elektródou, zatiaľ čo prúd je meraný medzi pracovnou a pomocnou elektródou. Získané výsledky merania sú spracované do závislosti prúdu na napätí, voltampérogramu <sup>23</sup>. Na vzniknutom voltampérograme sú dôležité body, ktoré reprezentujú potenciál anodického píku,  $E_{p,a}$ , potenciál katodického píku,  $E_{p,k}$ , a hodnoty maximálneho prúdu v anodickom a katodickom píku,  $I_{p,a}$  a  $I_{p,k}$ .

Pracovné elektródy využívané pri CV sú zvyčajne platinové pre anodické deje, pre negatívnu oblasť potenciálu ortuťové alebo amalgámové. Používajú sa taktiež elektródy zo skleneného uhlíku, uhlíkovej pasty, pyrolytického grafitu, zlata, vodičom dopovaného diamantu. Hlavný význam tejto metódy je predovšetkým diagnostický a spočíva v možnosti štúdia elektródových reakcií. Pretože difúzia je relatívne pomalý transportný proces, pri dostatočnej rýchlosti polarizácie elektródy nestačia produkty elektródovej reakcie úplne oddifundovať od jej povrchu a za vhodných podmienok ich možno pri opačnom smere potenciálovej zmeny detegovať <sup>22</sup>.

CV je užitočná pri získavaní informácií o redoxných potenciáloch a rozsahu elektrochemických reakcií v roztoku analytu <sup>23</sup>. Výška píku na voltampérometrických krivkách je priamo úmerná koncentrácii analytu, takže CV možno použiť i v kvantitatívnej analýze. V praxi sa to však využíva len zriedka <sup>22</sup>.

### 1.3.2. Diferenčná pulzná voltampérometria (DPV)

Pri všetkých pulzných metódach sa meranie prúdu (nazývané taktiež vzorkovanie) uskutočňuje iba po určitú, presne definovanú dobu. Cieľom je eliminovať negatívny vplyv nabíjacieho prúdu. Prúd sa preto meria v okamihu, kedy je pomer medzi difúznym a nabíjacím (kapacitným) prúdom čo najvhodnejší. Nameranú hodnotu prúdu uchováva pamäť meracieho prístroja až do doby ďalšieho vzorkovania. Výsledkom merania je voltampérogram, ktorý je tvorený „schodíkmi“ reprezentujúcimi vlastne spojené diskkrétne hodnoty zmeraného prúdu. Ich hustota je daná rýchlosťou vzorkovania a rýchlosťou zmeny potenciálu vkladaneho na elektródu.

Pri DPV sa potenciál lineárne meniaci sa s časom periodicky prekladá potenciálovými pulzami o amplitúdach rádovo v desiatkach mV a dobe trvania desiatok ms. Registruje sa rozdiel prúdov zmeraných tesne pred vložením potenciálového pulzu a na jeho konci – eliminuje sa tak spomínaný kapacitný prúd. Voltampérometrická krivka má miesto vlny tvar píku, ktorého výška je úmerná koncentrácii analytu. Poloha jeho vrcholu na potenciálovej ose,  $E_p$ , pre reverzibilné systémy zhruba odpovedá štandardnému potenciálu danej polreakcie <sup>24</sup>.

Odozva je akýmsi grafickým zobrazením prvej derivácie. Výsledné píky sú preto symetrické, pomerne ostré a z pohľadu jednoduchšie na vyhodnotenie. Ďalšou výhodou derivačnej odozvy pri DPV je možnosť získať dobre oddelené píky i pre analyty, ktorých potenciály pík sa líšia o 40 až 50 mV – na rozdiel od klasickej voltampérometrie, vyžadujúcej rozdiel aspoň 200 mV. DPV poskytuje možnosť stanoviť nižšie koncentrácie látok, vďaka svojej výrazne lepšej citlivosti detekcie v porovnaní s lineárnou voltampérometriou. Detekčný limit sa pohybuje okolo  $10^{-7}$  až  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Meraný prúd v DPV obsahuje ako zložku kontrolovanú difúziou, tak zložku, ktorá nemá vzťah k reakcii vo vrstve na povrchu elektródy definovanou Nernstovou rovnicou. Namerané prúdy sú teda niekoľkokrát vyššie než samotný difúzny prúd. Za bežných podmienok v miešanom roztoku sa roztok stane homogénnym vo vzťahu

ku koncentrácii analytu až v dobe, kedy dôjde k ďalšiemu pulzu. Pri každej hodnote vloženého napätia, každý pulz doprevadí rovnaký prúd, snažiaci sa vyrovnať koncentraciu analytu. Po vložení pulzu sa taktiež objaví nefaradaický prúd, ten však exponenciálne klesá a keď meriame prúd až vo chvíli, keď klesne takmer k nule, získame výrazne lepši pomer signálu a šumu a tým i vyššiu citlivosť merania.

DPV je vhodná pre kvalitatívnu analýzu i pre určenie analytu na základe porovnania potenciálu píku so štandardným potenciálom.<sup>22</sup>

## **1.4. Používané elektródy**

### **1.4.1. Obnoviteľná strieborná amalgámová filmová elektróda**

Výhodou ortuťových elektród je možnosť využívať ich k meraniu i pri relatívne vysokých negatívnych hodnotách potenciálov. Rad dôvodov prispieva k ich širokému využitiu vo voltampérometrii. Okrem veľkého meracieho rozsahu v oblasti negatívnych potenciálov je to predovšetkým skutočnosť, že mnohé kovy pri redukcii tvoria s ortuťou amalgám. To značne zjednodušuje prebiehajúci chemický dej alebo napomáha pri depozícii.

Ortuťové elektródy sa vyskytujú v rade foriem. Najjednoduchšia je ortuťový film vzniknutý vylúčením ortuťového povlaku na internom povrchu (napr. na disku z kovu či skleneného uhlíku). Ďalej je to visiaca ortuťová kvapková elektróda (HMDE, z angl. hanging mercury drop electrode) tvorená veľmi tenkou kapilárou pripojenou k rezervoáru s ortuťou. Piestom ovládaným mikrometrickou skrútkou sa vytlačí z kapiláry kvapka ortuti, ktorej veľkosť je vďaka (polo)automatickému ovládaniu piestu veľmi dobre reprodukovateľná. Často využívanou pri polarografických meraniach je klasická kvapkajúca ortuťová elektróda (DME, z angl. dropping mercury electrode). Zostáva z kapiláry s vnútorným priemerom okolo 0,05–0,07 mm a dĺžke 10–15 cm, ktorou preteká ortuť pod hydrostatickým tlakom z rezervoáru umiestneného vo výške medzi zhruba 50 až 100 cm. Výška rezervoáru sa volí tak, aby sa nová kvapka tvorila vždy po dvoch až šiestich sekundách <sup>22</sup>.

Obnoviteľné strieborné amalgámové filmové elektródy (Hg(Ag)FEs) boli



vyvinuté ako alternatíva k ortuťovej elektróde a ortuťovej filmovej elektróde <sup>25, 26</sup>. Pasivácia povrchu elektródy prispieva k zlej citlivosti elektród. Pasivácia je spôsobená nahromadením oxidov na povrchu, adsorpciou produktov redoxných reakcií, analytom samotným, prípadne časti vzorky a je častým problémom pri práci s pevnými elektródami. Čistiace procedúry sa využívajú na minimalizovanie negatívnych účinkov pasivácie <sup>27</sup>. Hg(Ag)FEs sú založené na jednoduchej mechanickej obnove strieborného amalgámového filmu na striebornom drôte opakovaným prejdením drôtu cez kvapku tekutého strieborného amalgámu s využitím piestového mechanizmu.

Úsilie obmedziť používanie kvapalnej ortute v laboratóriách je spojené s vývojom netoxických senzorov založených na amalgáme. Nové netoxické amalgámové elektródy založené na striebornom pevnom amalgáme boli predstavené v štúdií <sup>28</sup>. Hg(Ag)FE sú síce založené na kvapalnom amalgáme, avšak objem kvapalného strieborného amalgámu (približne 10  $\mu$ l) môže byť využívaný po dobu niekoľkých mesiacov <sup>25, 29, 30</sup>. Hg(Ag)FE sú menej toxická a "zelenšia" alternatíva k DME a HMDE vzhľadom k minimálnemu objemu kvapalného amalgámu uzavretému vo svojom vlastnom oddelenom priestore s dlhou životnosťou.

V práci <sup>26</sup> bola predstavená nová konštrukcia striebornej amalgámovej filmovej elektródy obnoviteľnej mechanizmom klikacieho pera RAE (retractable-pen-based renewable silver amalgam film electrode), ktorá predstavuje jednoduché a užívateľsky prívetivé konštrukčné riešenie k obnove povrchu elektródy a preto bola využívaná pri meraniach v tejto práci.

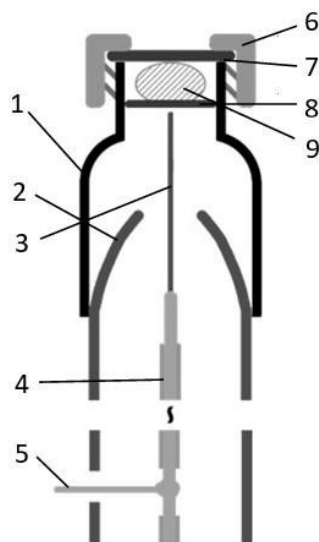
## 2. Experimentálna časť

### 2.1 Chemikálie a materiály

Zásobný roztok chloramfenikolu (CLF,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) s koncentráciou  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  bol pripravený rozpustením presne naváženeho množstva danej látky v  $25 \text{ cm}^3$  deionizovanej vody. Bol uchovávaný v tme pri laboratórnej teplote. Roztoky s nižšími molárnymi koncentráciami boli pripravované presným riedením zásobného roztoku destilovanou vodou. Všetky roztoky boli uchovávané v tme pri laboratórnej teplote.

Britton-Robinson (BR) pufoer o príslušnom pH bol pripravený zmiešaním kyslej zložky ( $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kyseliny fosforečnej, octovej a boritej) a zásaditej zložky ( $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  hydroxidu sodného) (všetko p.a. Lach-Ner, Česká republika).  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  roztok chloridu draselného (p.a. Lach Ner) bol použitý na aktiváciu RAE. Deionizovaná voda (merný odpor  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ,  $25^\circ \text{C}$ ) bola získaná systémom Millipore Milli-Q (Millipore, USA).

Elektroda s obnoviteľným povrchom <sup>26</sup> bola skonštruovaná zo strieborného drôtu ( $d = 0,5 \text{ mm}$ ). Tekutý amalgám bol pripravený zmiešaním strieborného prášku ( $\geq 99,9\%$ ,  $2\text{--}3,5 \text{ }\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) a tekutej ortute ( $99,999\%$ , Bome, Česká republika). RAE obsahovala tekutý amalgám so  $4\%$  obsahom striebra. Septá ( $d = 8 \text{ mm}$ , hrúbka  $0,045 \text{ in.}$  PTF/silicon, Supelco) a skrutkovacia polypropénová vialka s viečkom ( $1,5 \text{ ml}$ , vonkajší priemer x výška:  $12 \times 32 \text{ mm}$ ) boli použité na konštrukciu spodnej časti elektródy. Plastové klikacie pero bolo použité ako základný konštrukčný prvok elektródy (viď Obr. 2.1).



Obr. 2.1: Schéma RAE pozostávajúcej z plastovej vialky (1) prichytenej ku kostre klikacieho pera (2). Atramentová tuha bola nahradená drôtom pokrytým amalgámom (3) ( $d = 0,5$  mm) pripojeným k pevnému medenému drôtu (4) ( $d = 2$  mm) s kontaktom na potenciostat. Vialka má viečko (6) a drôt pokrytý amalgámom prechádza septom vo viečku (7) a septom ( $d = 6$  mm) prilepeným na vialku (8). To vytvára priestor pre kvapku ( $\sim 10$   $\mu$ l) tekutého amalgámu (9). Znáznomená elektróda je v tzv. „waiting state“, tj. pred prípravou nového amalgámového filmu pred vlastným záznamom voltampérogramu. Adaptované z <sup>26</sup>.

## 2.2 Aparatúra

Všetky voltampérogramy boli zaznamenané pomocou prístroja Eco-Tribo Polarograph kontrolovaným softvérom MultiElChem 2.4 a MultiElChem 3.2. (Polaro-Sensors, Česká republika). Elektrochemický článok zahrňoval tri elektródy. Pracovnú RAE,  $\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$  ako referenčnú elektródu (Elektrochemické detektory, Česká republika) a platinovú drôtkovú elektródu ako pomocnú (priemer 0,4 mm, dĺžka 2 mm).

Cyklická voltampérometria (CV) bola realizovaná pri rýchlosti skenu  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Parametre diferenčnej pulznej voltampérometrie (DPV) boli nasledovné:

rýchlosť skenu  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , výška pulzu  $-50 \text{ mV}$ , šírka pulzu  $100 \text{ ms}$  vrátane doby vzorkovania  $20 \text{ ms}$ . Presná hodnota pH pufrov bola overená použitím Jenway 3510 pH-metru s Jenway kombinovanou sklenenou elektródou typu 924005 (BibbyScientific, United Kingdom). Kalibrácia pH-metra bola uskutočnená štandardnými vodnými puframi pri laboratórnej teplote.

## 2.3 Pracovné postupy

Aktivácia RAE bola uskutočnená jedenkrát za deň na začiatku meraní. Pozostávala z aplikovania potenciálu  $-2,2 \text{ V}$  po dobu  $600 \text{ s}$  v  $0,2 \text{ M KCl}$  za prítomnosti kyslíka a za miešania roztoku. Po aktivácii bola RAE podrobená v príslušnom elektrolyte  $20$  ( $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) alebo viacerým cyklom cyklickej voltampérometrie až do stabilizácie zaznamenávaných voltampérogramov. Pred obnovením povrchu a následným meraním je potrebné dbať na to, aby zvyšková kvapalina bola z povrchu elektródy dokonale odstránená buničinou.

Pojem „obnova povrchu“ je spojený s pohybom drôtu cez amalgámovú kvapku vo vialke s nalepeným septom, čo vytvára nový čerstvý amalgámový film na povrchu strieborného drôtku. Toto obnovenie je založené na prekliknutí pera nahor a nadol.

Analyzovaný roztok bol pripravený pipetovaním daného objemu zásobného roztoku CLF do  $10 \text{ cm}^3$  odmernej banky a následným doplnením po rysku BR pufrom o príslušnom pH. Roztok bol následne po premiešaní prevedený do voltampérometrickej nádoby. Pred voltampérometrickým meraním bol roztok zbavený prítomnosti kyslíku prebublávaním dusíkom po dobu  $5 \text{ minút}$ . Následne bola zaznamenaná voltampérometrická krivka. Pred každým ďalším voltampérometrickým záznamom bol roztok prepublávaný už iba  $30 \text{ sekúnd}$ . Krivky základného elektrolytu boli merané trikrát a krivky so študovanou látkou boli merané trikrát pri meraní kalibračnej závislosti a päťkrát pri hľadaní optimálnych podmienok pre stanovenie CLF. Všetky merania boli uskutočnené pri laboratórnej teplote.

Výšky píkov boli vyhodnocované od priamky spájajúcej minimum

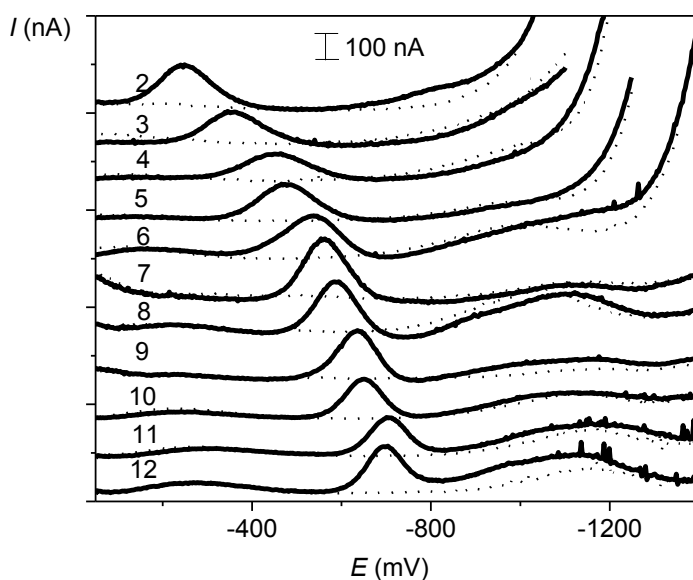
pred a po píku. Ku grafickému spracovaniu výsledkov bol využitý softvér Origin (OriginLab Corp. USA).

Medza stanoviteľnosti bola vyhodnotená na základe výpočtu desaťnásobku smerodajnej odchýlky prúdu pätnástich opakovaných meraní CLF s koncentráciou  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Chybové úsečky použité v grafoch závislosti prúdu píku  $I_p$  na pH roztoku a v závislosti potenciálu píku  $E_p$  na pH roztoku odpovedajú smerodajnej odchýlke. Intervaly pri parametroch lineárnej kalibračnej závislosti odpovedajú smerodajnej odchýlke vypočítanej pomocou softvéru Origin.

### 3. Výsledky a diskusia

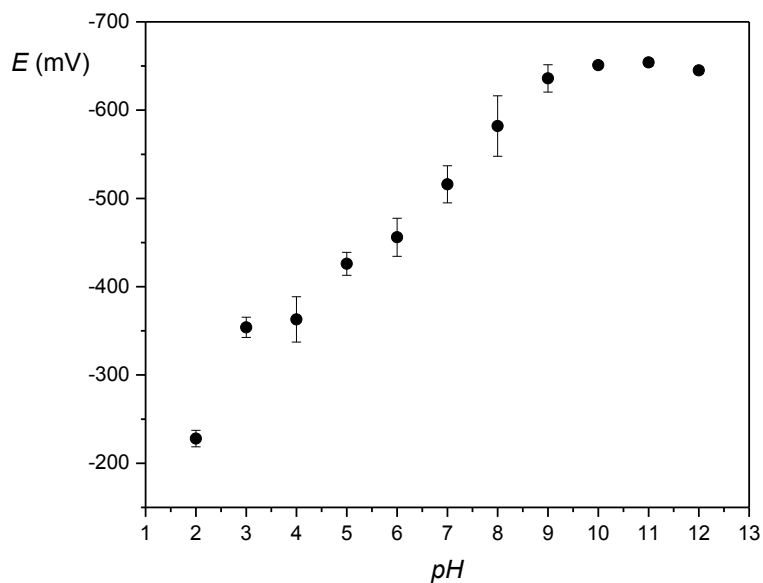
#### 3.1 Optimálne podmienky pre stanovenie chloramfenikolu (CLF)

Experimenty s cieľom stanoviť optimálne podmienky pre stanovenie CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) boli realizované metódou DPV na RAE v prostredí BR pufru s pH v rozmedzí hodnôt 2–12. Zaznamenané voltampérometrické krivky sú zobrazené na Obr. 3.1.1. Potenciál píkov lineárne klesal s rastúcim pH v rozmedzí pH 2–9 a v oblasti 9–12 sa ďalej významne nemenil. Závislosť potenciálu píku  $E_p$  a prúdu píku  $I_p$  na pH znázorňuje Obr. 3.1.2 a Obr. 3.1.3. Najvyšší pík chloramfenikol vykazoval pri pH 7. BR pufo r o tomto pH bol vyhodnotený ako optimálne prostredie. Vplyv pH na správanie CLF s koncentráciou  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pri DPV bol študovaný v práci <sup>17</sup>, kde merania boli realizované pomocou m-AgSAE a optimálnym prostredím bol vyhodnotený BR pufo r o hodnote pH 8, kde CLF poskytoval najvyššiu a najlepšie vyhodnotiteľnú vlnu. Potenciál pík v uvedenej práci lineárne klesal s rastúcim pH hodnôt od 2 až po 12. Predpoklad obdobného správania RAE a m-AgSAE bol teda čiastočne naplnený.

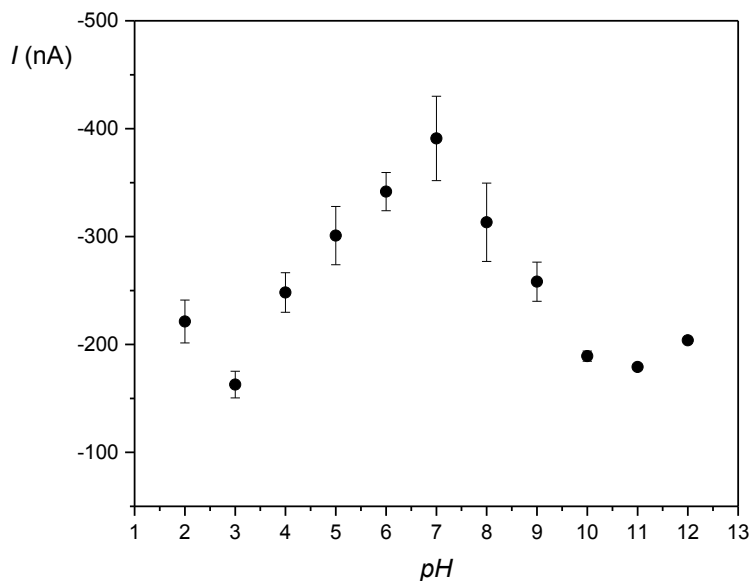


Obr. 3.1.1: Voltampérogramy CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 2–12. Hodnoty pH pufov odpovedajú číslam

kriviek v grafe. Obnovenie povrchu elektródy nastalo pred každou zmenou zloženia roztoku. Voltampérogram znázorňuje piate meranie od obnovenia povrchu elektródy. Bodkovaná čiara predstavuje základný elektrolyt.



Obr. 3.1.2: Závislosť potenciálu píku  $E_p$  CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) na pH roztoku. Merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 2–12.

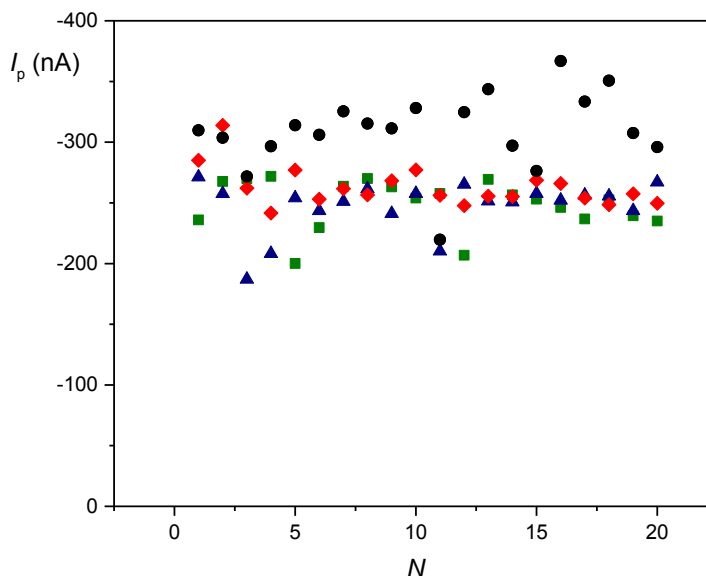


Obr. 3.1.3: Závislosť prúdu píku  $I_p$  CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) na pH roztoku. Merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 2–12.

### 3.2 Analytické parametre

Pri optimálnom pH BR pufru 7 boli uskutočnené opakované merania CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) s obnovou povrchu na začiatku série 20 meraní a s obnovou povrchu pred každým meraním série 20 meraní. Grafické znázornenie závislosti prúdu píku  $I_p$  na poradovom čísle merania  $N$  je na Obr. 3.2.1. RSD pre sériu s obnovovaním povrchu pred každým meraním je 10,1 % a pre sériu merané na jednom povrchu je 6,2 % pre body značené červenými kosoštvorcami; 8,7 % modrými trojuholníkmi; 8,2 % zelenými štvorcami, celkovo teda  $8,2 \pm 1,5\%$ . V porovnaní s prácou <sup>17</sup>, kde bol CLF stanovovaný na m-AgSAE, bola nameraná hodnota RSD = 4,1 % pre merania bez regenerácie, ktoré vykazovali lepšie výsledky ako merania s elektrochemickou regeneráciou.





Obr. 3.2.1: Závislosť prúdu píku  $I_p$  CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) na poradovom čísle merania ( $N$ ) v prostredí BR pufru o pH 7, merané technikou DPV na RAE elektróde. Čierne kruhové body – obnovenie povrchu elektródy pred každým meraním série. Ostatné farebné (červené kosoštvorcové, modré trojuholníkové, zelené štvorcové) body – jednotlivé série, kedy obnovenie povrchu elektródy nastalo na začiatku série 20 meraní.

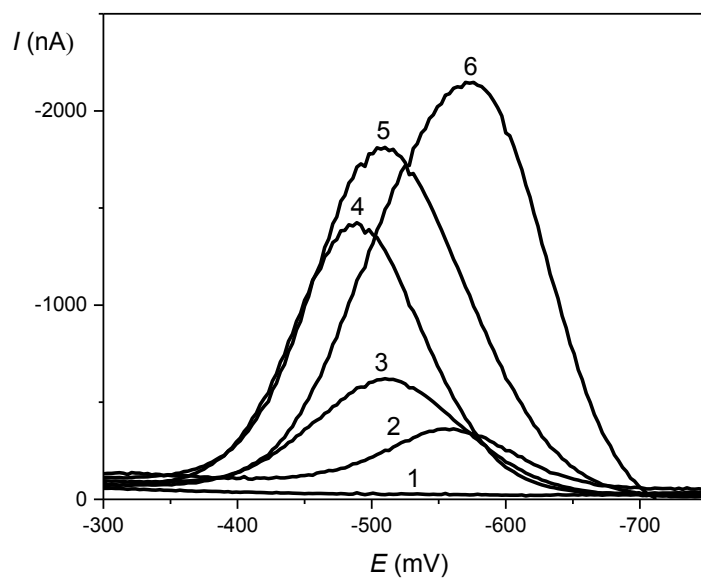
V prípade stanovenia CLF na RAE nemá obnova povrchu výraznejší vplyv na opakovateľnosť meraní. Výhody obnovy povrchu elektródy sa môžu výraznejšie prejavovať pri stanovení látok v matriciach, ktoré pasivujú povrch elektródy. Ďalšie merania boli teda uskutočňované bez obnovy povrchu pred každým meraním. Obnova povrchu bola uskutočnená iba pred zmenou zloženia roztoku.

### 3.3. Kalibračná závislosť

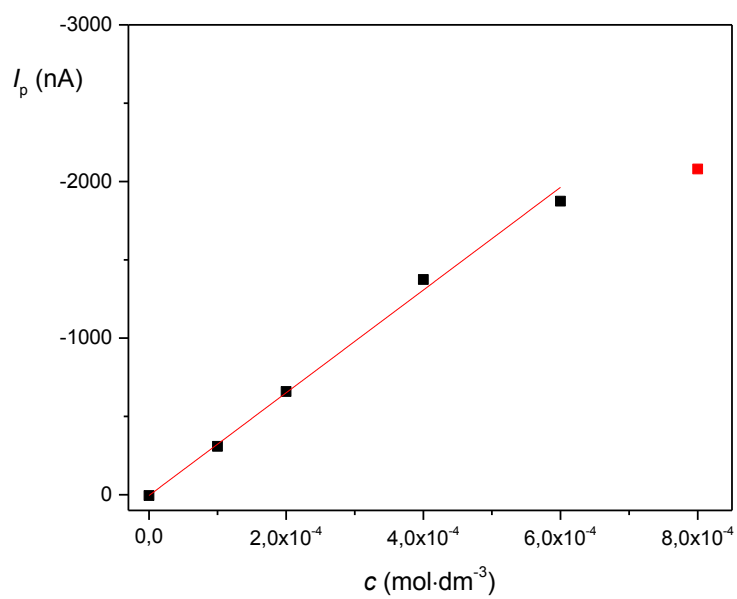
V prostredí BR pufru o pH 7 bola premeraná kalibračná závislosť CLF v koncentračnom rozmedzí od  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  až po  $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  metódou DPV na RAE. Namerané voltampérogramy pre rozmedzie  $(1-8) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  sú

znázornené na Obr. 3.3.1, pre  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  na Obr. 3.3.3. Rozmedzie  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  sa nepodarilo namerať. Závislosť prúdu píku  $I_p$  na koncentrácii CLF v rozmedzí  $(1-8) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  je znázornená na Obr. 3.3.2. Merania s koncentráciou  $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  neboli uvažované do kalibračnej závislosti, pretože sa odchyľovali od lineárneho priebehu. Závislosť prúdu píku  $I_p$  na koncentrácii CLF v rozmedzí  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  je znázornená na Obr. 3.3.4. Parametre kalibračných závislostí a medza stanoviteľnosti sú uvedené v Tab. 3.3.1. Pre kontrolu opakovateľnosti výšky píku za daných podmienok boli uskutočnené opakované merania pri koncentrácii  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (RSD = 18,4 %), znázornené na Obr. 3.3.5. Dosiahnutá medza stanoviteľnosti bola  $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Vyššia medza stanoviteľnosti je daná opakovateľnosťou meraní bez ohľadu na úroveň šumu základného elektrolytu.

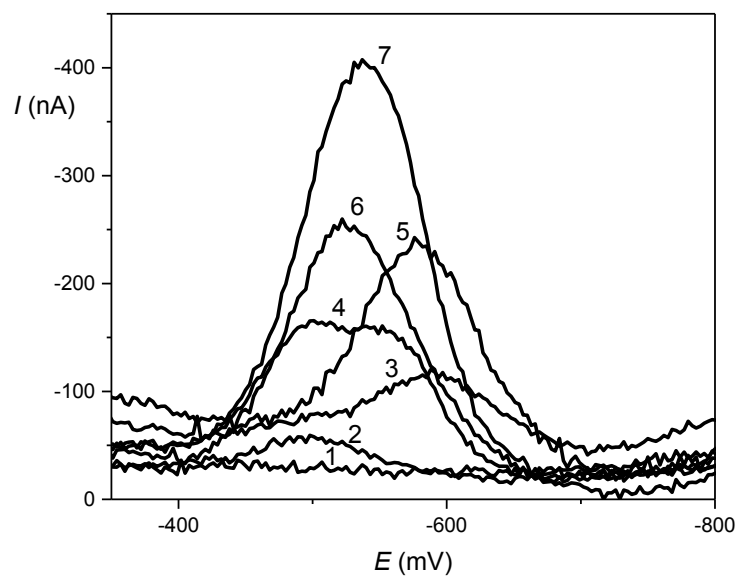
Obr. 3.3.6 ukazuje, že pozícia píku CLF v potenciálovom okne pri opakovaných meraniach nie je príliš stála. Variabilita potenciálov u RAE je jav bližšie študovaný v <sup>26</sup>. Posuny pík potenciálu nastávajú u niektorých analytov citlivých na morfológiu povrchu elektródy na úrovni  $\pm 50 \text{ mV}$ . Práca <sup>26</sup> ponúka vysvetlenie, že zlá opakovateľnosť potenciálu píku je pravdepodobne spôsobená faktom, že obnova povrchu neposkytuje vždy tekutý amalgámový film rovnakej kvality a povrchovej štruktúry. Napriek tomu získané kalibračné závislosti dokladajú, že variabilita v potenciáloch pík nemá zásadný vplyv na výšku píku pri danej koncentrácii. Tejto variabilite však bude nutné venovať pozornosť pri ďalšom štúdiu RAE.



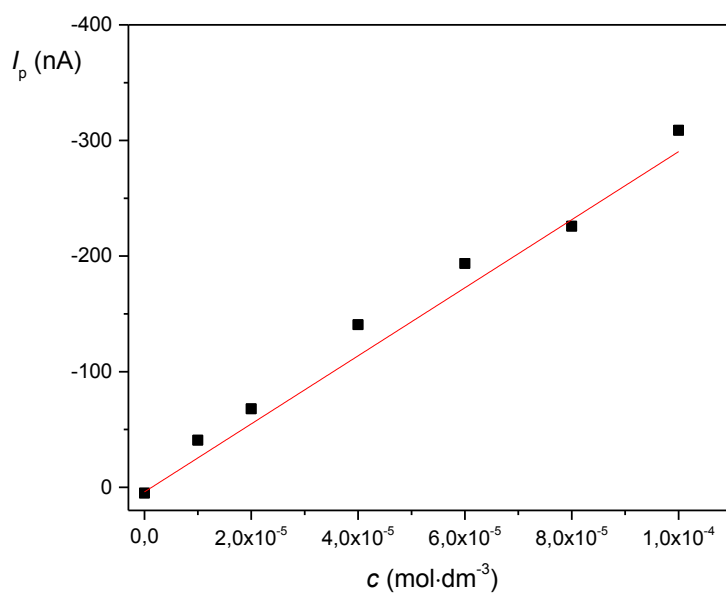
Obr. 3.3.1: Voltampérogramy CLF merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 7.  $c$  (CLF): 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6)  $\cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .



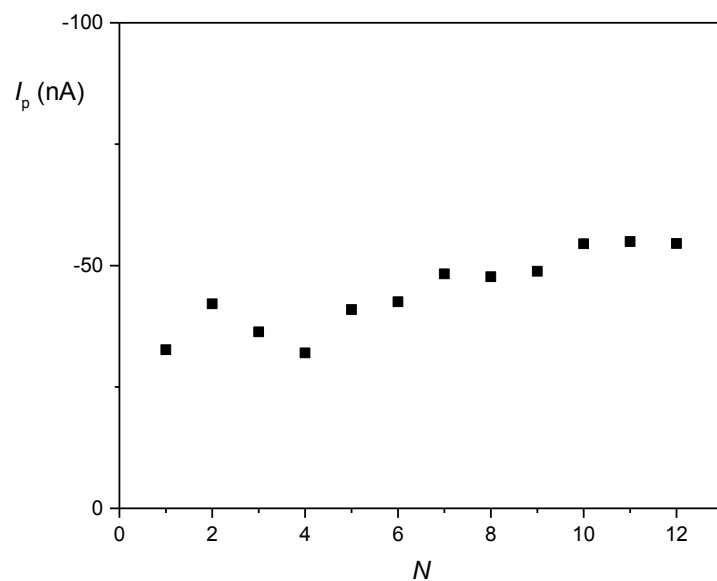
Obr. 3.3.2: Závislosť prúdu píku  $I_p$  na koncentrácii CLF v rozmedzí  $(1-8) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 7.



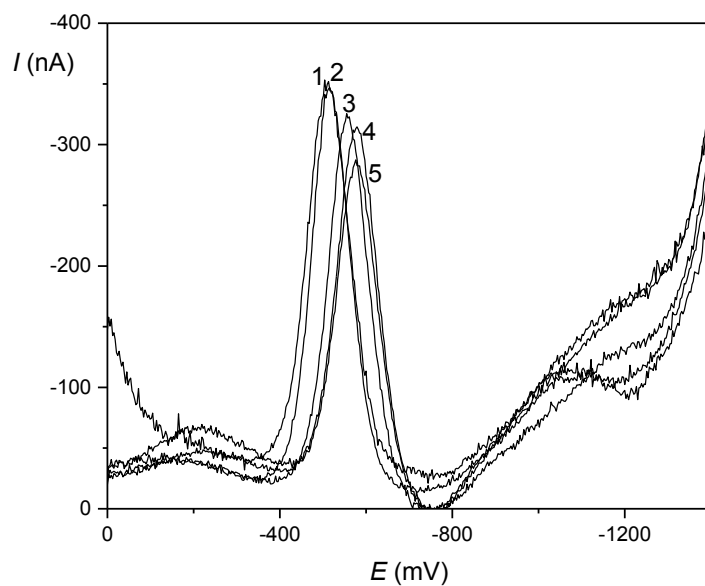
Obr. 3.3.3: Voltampérogramy CLF merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 7.  $c$  (CLF): 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6), 10 (7)  $\cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .



Obr. 3.3.4: Závislosť prúdu píku  $I_p$  na koncentrácii CLF v rozmedzí  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Merané technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 7.



Obr. 3.3.5: Závislosť prúdu píku  $I_p$  CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) na poradovom čísle merania ( $N$ ) v prostredí BR pufru o pH 7, merané technikou DPV na RAE elektróde.



Obr. 3.3.6: Sériá piatich voltampérogramov CLF ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) meraných technikou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 7. Obnovenie povrchu

bolo prevedené na začiatku série. Číslovanie voltampérogramov zodpovedá poradiu ich vyhotovenia.

Tab. 3.3.1: Parametre kalibračných priamok pre stanovenie CLF metódou DPV na RAE v prostredí BR pufru o pH 7.

Koncentrácia [mol·dm <sup>-3</sup> ]	Úsek [nA]	Smernica [nA·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> ]	Korelačný koeficient	LOQ [mol·dm <sup>-3</sup> ]
(1–8)·10 <sup>-4</sup>	4,8±4,8	(–3,279±0,083)·10 <sup>6</sup>	–0,9990	-
(1–10)·10 <sup>-5</sup>	4,0±3,4	(–2,944±0,094)·10 <sup>6</sup>	–0,9975	1,4·10 <sup>-5</sup>

## 4. Záver

Pomocou techniky diferenčnej pulznej voltampérometrie (DPV) bol študovaný chloramfenikol (CLF) na striebornej amalgámovej filmovej elektróde obnoviteľnej mechanizmom klikacieho pera. Bolo zistené, že poskytuje v prostredí BR pufru od pH 2 do pH 12 jeden pík. Ako optimálne prostredie pre stanovenie CLF pomocou DPV bol vyhodnotený BR pufr o pH 7. Za týchto podmienok boli premerané kalibračné závislosti v koncentračnom rozsahu od  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  až po  $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Dosiahnutá medza stanoviteľnosti bola  $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Nižšia citlivosť v porovnaní s prácou <sup>17</sup>, kde na m-AgSAE medza stanoviteľnosti činila  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , je vyvážená možnosťou jednoduchšej mechanickej obnovy povrchu u tohto typu elektródy. Problémom zostáva zlá reprodukovateľnosť potenciálu píku.

## 5. Literatúra

1. ČR, M. zdravotnictví. *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl)*, Grada Publishing a.s., 2017.
2. Talebizadehsardari, P., Aramesh-Boroujeni, Z., Foroughi, M.M., Eyvazina, A., Jahani, Sh., Faramarzpour, H. R., Borhani, F., Ghazanfarabadi, M., Shabani, M., Nazari, A. H., Synthesis of carnation-like  $\text{Ho}_3\text{+}/\text{Co}_3\text{O}_4$  nanoflowers as a modifier for electrochemical determination of chloramphenicol in eye drop. *Microchemical Journal* **159**, 105535 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105535>.
3. Yugatama, A., Nurmalinda, R., Rohmani, S., Ermawati, D. E., Prihapsara, F. Effect of Temperature and Length of Storage to Chloramphenicol Eye Drop's Concentration. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **578**, 012055 (2019), <https://doi.org/10.1088/1757-899X/578/1/012055>.
4. Agüí, L., Guzmán, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analytica Chimica Acta* **461**, 65–73 (2002), [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00245-3).
5. Ambrose, P. J. Clinical Pharmacokinetics of Chloramphenicol and Chloramphenicol Succinate. *Clinical Pharmacokinetics* **9**, 222–238 (1984), <https://doi.org/10.2165/00003088-198409030-00004>.
6. Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **619**, 54–58 (2008), <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.026>.
7. Ferguson, J., Baxter, A., Young, P., Kennedy, G., Elliott, Ch., Weigel, S., Gattermann, R., Ashwin, H., Stead, S., Sharman, M., Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta* **529**, 109–113 (2005), <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.042>.



8. Veach, B. T. Determination of Chloramphenicol and Nitrofurantoin Metabolites in Cobia, Croaker, and Shrimp Using Microwave-Assisted Derivatization, Automated SPE, and LC-MS/MS-Results from a US Food and Drug Administration Level Three Inter-Laboratory Study. *Journal of AOAC International* **103**, 1043–1051 (2020), <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa019>.
9. Aravind, M., Miceli, J., Kauffman, R., Strebel, L., Done, A. Simultaneous Measurement of Chloramphenicol and Chloramphenicol Succinate by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography* **221**, 176–181 (1980), [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)81022-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)81022-1).
10. Shen, J., Xia, X., Jiang, H., Li, C., Li, J., Li, X., Ding, S., Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **877**, 1523–1529 (2009), <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.040>.
11. Bergnerlang, B., Kachele, M. A Quick Method to Determine Chloramphenicol in Milk by Way of Gas-Chromatography. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **81**, 278–280 (1985).
12. Hassan, S., Eldesouki, M. Determination of Chloramphenicol in Pharmaceutical Preparations by the Cadmium Ion-Selective Electrode, Spectrophotometry and Atomic-Absorption Spectrometry. *Talanta* **26**, 531–536 (1979), [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(79\)80085-5](https://doi.org/10.1016/0039-9140(79)80085-5).
13. Jin, W. R., Ye, X. Y., Yu, D. Q., Dong, Q. Measurement of chloramphenicol by capillary zone electrophoresis following end-column amperometric detection at a carbon fiber micro-disk array electrode. *Journal of Chromatography B* **741**, 155–162 (2000), [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00049-9).
14. Wang, A. B., Zhang, L., Fang, Y. Z. Determination and separation of chloramphenicol and its hydrolysate in eye-drops by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta* **394**, 309–316 (1999), [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00314-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00314-1).

15. Imran, M., Habib, F., Majeed, S., Tawab, A., Rauf, W., Rhmann, M., Umer, M., Iqbal, M., LC-MS/MS-based determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry meat from the Punjab-Pakistan. *Food Additives & Contaminants: Part A* **35**, 1530–1542 (2018), <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1463569>.
16. Ječmínková, J. Voltametrické stanovení chloramfenikolu a ofloxacinu na borem dopované diamantové filmové elektrodě, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
17. Štěpánka Havlíková. Voltametrické stanovení chloramfenikolu a chlorambucilu na amalgámových elektrodách, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2015.
18. Samsonova, J. V., Cannavan, A., Elliott, C. T. A Critical Review of Screening Methods for the Detection of Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol Residues in Foodstuffs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **42**, 50–78 (2012), <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.629951>.
19. Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29**, 1038–1049 (2010), <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>.
20. Sadeghi, A. S., Ansari, N., Ramezani, M., Abnous, K., Mohsenzadeh, M., Taghdisi, S. M., Alibolandi, M., Optical and electrochemical aptasensors for the detection of amphenicols. *Biosensors and Bioelectronics* **118**, 137–152 (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.045>.
21. Vyskočil, V., Barek, J. Electroanalysis of Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Current Organic Chemistry* **15**, 3059–3076 (2011), <https://doi.org/10.2174/138527211798357209>.
22. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. & Crouch, S. R. *Analytická chemie*, Vysoká škol chemicko-technologická v Praze, Praha 2019.
23. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J., Reimhult, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors* **8**, 1400–1458 (2008), <https://doi.org/10.3390/s8031400>.

24. Wang, J. Potentiometry. in *Analytical Electrochemistry* 165–200, John Wiley & Sons, Ltd, 2006, <https://doi.org/10.1002/0471790303.ch5>.
25. Bas, B. Refreshable mercury film silver based electrode for determination of chromium(VI) using catalytic adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* **570**, 195–201 (2006), <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.013>.
26. Gajdar, J., Stafurova, K., Barek, J., Fischer, J. Retractable-pen-based renewable silver amalgam film electrode for microliter sample analysis of electrochemically reducible environmental pollutants. *Sensors and Actuators B: Chemical* **329**, 129057 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129057>.
27. Lawrence, N. S., Beckett, E. L., Davis, J., Compton, R. G. Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. *Analytical Biochemistry* **303**, 1–16 (2002), <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5584>.
28. Yosypchuk, B., Novotny, L. Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. *Electroanalysis* **14**, 1733–1738 (2002), <https://doi.org/10.1002/elan.200290018>.
29. Bobrowski, A., Krolicka, A., Bobrowski, R. Renewable silver amalgam film electrodes in electrochemical stripping analysis-a review. *Journal of Solid State Electrochemistry* **20**, 3217–3228 (2016), <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3275-7>.
30. Smarzewska, S., Metelka, R., Bas, B., Vytras, K. Recent Applications of Silver Amalgam Electrodes for Analysis of Pharmaceuticals and Vitamins. *Current Medicinal Chemistry* **25**, 4138–4151 (2018), <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920143245>.